



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
11 DE 37 35 872 A 1

51 Int. Cl. 4:
G01N 27/26
B 01 D 57/02

21 Aktenzeichen: P 37 35 872.3
22 Anmeldetag: 23. 10. 87
43 Offenlegungstag: 3. 8. 89

DE 37 35 872 A 1

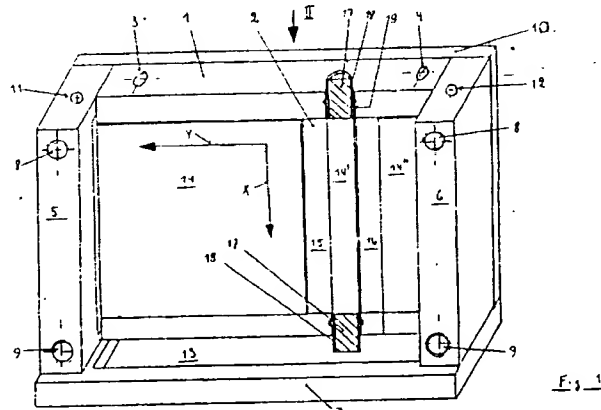
71 Anmelder:
Schütt Labortechnik GmbH, 3400 Göttingen, DE

74 Vertreter:
Röse, H., Dipl.-Ing.; Kosel, P., Dipl.-Ing.; Sobisch, P.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 3353 Bad Gandersheim

72 Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

54 Vorrichtung zum Fraktionieren einer Analysenprobe

Bei der zweidimensionalen elektrophoretischen Zerlegung einer Analysenprobe mußte ein die isoelektrisch fokussierten Komponenten enthaltender Gelkörper aus einer ersten Trennvorrichtung entnommen und zwecks weiterer Zerlegung im Rahmen der »zweiten Dimension« in eine andere Trennvorrichtung eingebettet werden, in welcher in einer zur Trennrichtung der genannten ersten Vorrichtung senkrechten Richtung eine weitere Aufspaltung vorgenommen wurde, so daß als Analysenergebnis sich ein in einer Gelschicht fixiertes Flächenmuster ergab. Die Überführung der genannten ersten Gelschicht zwischen den beiden Trennvorrichtungen ist jedoch mit einer Reihe von Nachteilen verbunden. Bei einer erfindungsgemäßen Vorrichtung hingegen werden die Trennvorgänge beider Dimensionen in einer einzigen Vorrichtung durchgeführt, so daß die Überführung der genannten ersten Gelschicht (14') zwischen zwei Vorrichtungen entfällt. Zu diesem Zweck sind drei Gelschichten (14, 14', 14'') zwischen zwei Glasplatten (1) gehalten, wobei die mittlere Gelschicht (14') dem Trennvorgang der ersten Dimension und ein Verbundkörper aus allen drei Gelschichten dem Trennvorgang der zweiten Dimension dient.



DE 37 35 872 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung entsprechend dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Elektrophoretische Trennverfahren zur Zerlegung von beispielsweise Proteingemischen in unterschiedliche Komponenten sind grundsätzlich bekannt. Hierbei findet eine Trennung geladener Teilchen entsprechend deren Beweglichkeit bzw. elektrophoretischer Wanderungsfähigkeit in einem elektrischen Feld statt. Die Wanderung der Teilchen kann in einer Dispersion oder an einem sonstigen Trägermedium erfolgen.

Die Wanderungsfähigkeit wird maßgeblich vom Ladungszustand der Teilchen bestimmt, welcher seinerseits durch den pH-Wert dessen Umgebung beeinflusst wird. Eine Bewegung der Teilchen in einem Medium findet hiernach so lange statt, bis der sogenannte isoelektrische Punkt erreicht ist.

Es sind zweidimensionale elektrophoretische Trennverfahren bekannt, bei welchen in einem ersten Schritt, nämlich der ersten Dimension in einem länglichen, beispielsweise zylinderrförmigen Gelkörper durch Einstellung unterschiedlicher pH-Werte in dessen Längsrichtung eine erste Zerlegung und isoelektrische Fokussierung einzelner Komponenten einer Analysenprobe vorgenommen wird. Diese erste Zerlegung der Probe findet in einer ersten Vorrichtung statt. Um die genannten, in Längsrichtung des Gelkörpers voneinander getrennten Komponenten der Probe noch weiter aufzuspalten, wird der genannte Gelkörper nunmehr in eine zweite Vorrichtung eingebettet, wobei durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zur Längsrichtung des genannten Gelkörpers nunmehr die einzelnen Komponenten in eine flächenhafte Gelschicht überführt werden und nochmals entsprechend ihrer elektrophoretischen Bewegungsfähigkeit innerhalb der letztgenannten Gelschicht aufgespalten werden. Diese letzte Gelschicht enthält das Analysenergebnis als zweidimensionales Flächenmuster, welches einer unmittelbaren Auswertung zugänglich ist.

Von Nachteil bei dieser bekannten zweidimensionalen Untersuchungstechnik ist jedoch, daß der dem ersten Trennvorgang zugeordnete, die isoelektrisch fokussierten Komponenten enthaltende Gelkörper zwischen zwei Trennvorrichtungen bewegt werden muß, welches den Untersuchungsvorgang verzögert und auch angesichts der geringen Stabilität des Gelkörpers problematisch ist.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zum elektrophoretischen Zerlegen einer Analysenprobe zu entwerfen, bei welcher unter Vermeidung der dem Stand der Technik eigenen Nachteile ein durch flächenhafte Abbildung charakterisiertes Analysenergebnis schnell und einfach erzielbar ist. Gelöst ist diese Aufgabe bei einer gattungsgemäßen Vorrichtung durch die Merkmale des Kennzeichnungsteils des Anspruchs 1.

Erfindungswesentlich ist, daß beide aufeinanderfolgenden Trennvorgänge der zweidimensionalen Elektrophorese in einer einzigen Vorrichtung zusammengefaßt sind, so daß eine Bewegung des Trennschicht- bzw. Gelkörpers der "ersten Dimension" während des Analysenvorgangs entfällt. Die genannten Einrichtungen zur Erzeugung zueinander senkrecht gerichteter elektrischer Felder können räumlich grundsätzlich beliebig angeordnet sein — sie müssen nur nacheinander aktivierbar sein. Die Verfahrenstechnik der isoelektrischen Fokussierung der Komponenten der Analysenprobe im Rahmen eines ersten Trennvorganges, nämlich der genannten

"ersten Dimension" kann grundsätzlich in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. In dieser Betriebsphase wird die genannte zweite Einrichtung unwirksam sein. Dies kann auf vielfältige Weise geschehen. Beispielsweise kann in dieser Betriebsphase die der Fokussierung dienende Gelschicht mit Abstand von den dem Trennvorgang der "zweiten Dimension" dienenden Gelschichten angeordnet sein. Während der Durchführung des Trennvorgangs der "zweiten Dimension" ist hingegen die erste der beiden genannten Einrichtungen unwirksam.

Die Merkmale der Ansprüche 3 und 4 stellen eine besonders vorteilhafte Ausgestaltung des Erfindungsgegenstands dar. Die beiden seitlichen Gelschichten stehen in unmittelbarem Flüssigkeitskontakt mit der in den seitlichen Behältern angeordneten Pufferlösungen. Zur Durchführung des Trennverfahrens der zweiten Dimension werden hierbei lediglich die zwischen den drei Gelschichten befindlichen beiden Zwischenräume mit einem schnell polymerisierbaren Gel ausgefüllt, so daß die in der mittleren Gelschicht enthaltenen Komponenten entsprechend der Richtung des elektrischen Feldes aus diesem austreten, können, um in der genannten Richtung entsprechend deren Beweglichkeit weiter aufgespalten zu werden.

Die Beaufschlagung der die Gelschichten haltenden Glasplatten mit einem Kühlmedium gemäß den Merkmalen des Anspruchs 5 bringt den Vorteil mit sich, daß im Rahmen der Trennvorgänge hohe elektrische Feldstärken eingesetzt werden können, wodurch der Zerlegungsvorgang beschleunigt werden kann. Im Bedarfsfall kann auf diesem Wege jedoch auch eine genaue Temperierung der Glasplatten erreicht werden.

Die Merkmale der Ansprüche 5 bis 8 sind auf vorteilhafte apparative Merkmale der erfindungsgemäßen Vorrichtung gerichtet, welche sich durch einen kompakten, an dem Kriterium der einfachen Handhabbarkeit orientierten Aufbau auszeichnet. So ist die aufrechte Anordnung der Glasplatten insoweit von Vorteil, als hierdurch die Einbringung der einzelnen Analysenprobe erleichtert wird.

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf das in den Zeichnungen dargestellte Ausführungsbeispiel näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 eine perspektivische Darstellung eines teilweise geöffneten Ausführungsbeispiels der erfindungsgemäßen Vorrichtung;

Fig. 2 eine Draufsicht auf eine vollständige Vorrichtung entsprechend dem Pfeil II der Fig. 1.

Mit 1 ist in Fig. 1 ein eine Glasplatte 2 teilweise umgebender Rahmen bezeichnet, der mit letzterer einen geschlossenen Hohlkörper bildet und über die Anschlußbehörden 3, 4 mit einem Kühlmittel durchströmt wird. Der Rahmen 1 kann beispielsweise als Plexiglaskörper ausgebildet sein.

Mit 5, 6 sind beiderseits der Rahmen 1 aufrecht angeordnete quaderförmige Behältnisse bezeichnet, die auf einem gemeinsamen Bodengestell 7 aufgelagert sind. Die Behältnisse 5, 6 weisen jeweils zwei vertikal mit Abstand übereinander angeordnete Anschlußöffnungen 8, 9 auf. Die Befestigung der Behältnisse 5, 6 an dem Bodengestell 7 ist nicht näher dargestellt und kann an sich beliebig ausgeführt sein. Mit 10 ist eine, den rückwärtigen Abschluß der gesamten Vorrichtung bildende, die Behältnisse 5, 6 miteinander verbindende Abschlußplatte bezeichnet, welche ebenfalls auf dem Bodengestell 7 aufgelagert ist.

Die Behältnisse 5, 6 dienen jeweils der Aufnahme ei-

ner Pufferlösung, in welche zeichnerisch nur schematisch ange deutete Elektroden 11, 12 hineinragen. Diese Elektroden 11, 12 stehen mit einer zeichnerisch nicht dargestellten Spannungsquelle in Verbindung.

An die Anschlußbohrungen 8, 9 ist jeweils zeichnerisch nicht dargestellte, eine Pumpe sowie eine Kühleinrichtung umfassende Kreislaufführung angeschlossen, so daß die in den Behältnissen 5, 6 enthaltene Pufferlösung auch im Betrieb der Vorrichtung auf einer vorgebbaren Temperatur gehalten werden kann.

Das Bodengestell 7 weist eine trogartige Ausnehmung 13 auf, die der Aufnahme einer Elektrodenlösung dienendes Behältnis bildet.

Wie aus Fig. 2 hervorgeht, sind insgesamt zwei im wesentlichen identische, jeweils aus einem Rahmen 1 und einer Glasplatte 2 bestehende Systeme innerhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtung vorgesehen. Zwischen diesen beiden Systemen befinden sich — wie in Fig. 1 im einzelnen erkennbar ist — insgesamt drei Gelschichten 14, 14' und 14'', die vor der bestimmungsgemäßen Benutzung der Vorrichtung zwischen die Glasplatten 2 gebracht werden. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß zwischen die Glasscheiben Gummistreifen gelegt werden, anschließend die Gellösungen in die verbleibenden Zwischenräume eingegossen werden und wobei nach Polymerisation der Gellösungen die genannten Gummistreifen entfernt werden. Beiderseits der Gelschicht 14' befinden sich in diesem Stadium Zwischenräume 15, 16, so daß die Gelschichten 14 bis 14'' untereinander nicht in Berührung stehen.

Die Gelschichten 14 und 14'' hingegen haben auf ihren, den Behältnissen 5, 6 zugekehrten Enden Kontakt zu den in diesen Behältnissen enthaltenen Pufferlösungen. Die nähere Gestaltung dieser Verbindungen kann jedoch grundsätzlich beliebig ausgebildet sein und ist in der Zeichnung nicht näher dargestellt. Jeweils der ober- und der unterseitige Abschluß der Gelschicht 14' wird durch ein Kontaktgel 17 gebildet, welches in ein Rohrelement 18 eingesetzt ist, das seinerseits dichtend in jeweils eine, die ober- bzw. unterseitigen Rahmen durchdringende Bohrung 19 eingesetzt ist. Während das untere Rohrelement 18 in die genannte trogartige Ausnehmung 13 des Bodengestells 7 und damit in die in diesem gehaltene Elektrodenlösung eintaucht, ist das obere Rohrelement 18 mit einem zeichnerisch nicht dargestellten, ebenfalls eine Elektrodenlösung enthaltenden Behältnis in Verbindung bringbar.

Das durch die beiden Rahmen 1, die Behältnisse 5, 6 und das Bodengestell 7 gebildete Gesamtsystem ist — von den dargestellten funktionalen Verbindungen abgesehen — im übrigen dichtend verschraubt.

Die nach der Methode der Elektrophorese zu untersuchende Analysenprobe wird vor Beginn der Untersuchung in die Gelschicht 14' eingebracht. Dies kann erfindungsgemäß dadurch geschehen, daß beim Gießen dieser Schicht an deren Oberseite eine Aussparung verbleibt, in welche die Analysenprobe eingebracht wird, so daß letztere durch die Gelschicht 14' unterschichtet wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß beim Gießen der Gelschicht 14' eine Aussparung belassen wird, welche durch die in diese eingefüllte Analysenprobe teilweise ausgefüllt wird, wobei nach erfolgter Polymerisation der Rest der verbleibenden Aussparung mit einer der übrigen Gelschicht 14' entsprechenden Substanz ausgegossen wird.

Im folgenden wird kurz auf die Wirkungsweise der erfindungsgemäßen Vorrichtung eingegangen werden:

Es wird vorausgesetzt, daß die genannten Gelschich-

ten 14, 14' und 14'' mit der Analysenprobe in geeigneter Weise zwischen die Glasplatten verbracht worden sind, daß letztere zwischen die Behältnisse 5, 6 plaziert worden sind, so daß das untere Rohrelement 17 in die in der Ausnehmung 13 befindliche Elektrodenlösung eintaucht, in den seitlichen Behältnissen 5, 6 befindet sich eine Pufferlösung, welche mit den Gelschichten 14 und 14'' in Verbindung steht, wobei jedoch die Zwischenräume 15, 16 beiderseits der zentralen Gelschicht 14' leer sind. An das obere Rohrelement 17 wird nunmehr ein ebenfalls eine Elektrodenlösung enthaltendes Behältnis angeschlossen, wobei die in letzterem enthaltene Elektrodenlösung beispielsweise stark basisch und die in der Ausnehmung 13 befindliche Elektrodenlösung stark sauer eingestellt ist. Beide letztgenannte Elektrodenlösungen wirken mit Elektroden unterschiedlicher Polarität zusammen, die wiederum mit einer Spannungsquelle in Verbindung gebracht werden. Entsprechend der Polarität und Intensität des sich in der Gelschicht 14' ausbildenden elektrischen Feldes sowie des sich entlang der Gelschicht 14' ändernden pH-Wertes findet eine dementsprechende Bewegung der einzelnen Ladungsträger der Analysenprobe statt, so daß sich entlang der Gelschicht 14' parallel zu der Richtung X eine für die zu untersuchende Analysenprobe charakteristische, von der elektrophoretischen Wanderungsfähigkeit abhängige Verteilung der einzelnen Komponenten der Probe ergibt. Nachdem der Endzustand dieses ersten, innerhalb der Gelschicht 14' ablaufenden Trennvorganges erreicht ist, werden über zeichnerisch nicht dargestellte Bohrungen die beiderseits der Gelschicht 14' bestehenden Zwischenräume 15, 16 mit einer schnell polymerisierenden Gellösung ausgefüllt, so daß nunmehr ein Kontakt der Gelschicht 14' mit den übrigen Gelschichten 14 und 14'' besteht. Gleichzeitig wird die Verbindung der Gelschicht 14', insbesondere der Kontaktgele 17 mit den diesen zugeordneten Elektrodenlösungen unterbrochen. Über das, nunmehr die Gelschichten 14, 14' und 14'' durchdringende, mittels der Elektroden 11, 12 erzeugte elektrische Feld findet nunmehr eine zweite Trennung entsprechend der elektrophoretischen Wanderungsfähigkeit der einzelnen, in der Gelschicht 14' fokussierten Komponenten statt, so daß sich nunmehr in der Richtung Y senkrecht zu der Richtung X ein charakteristisches, eine weitere Unterscheidung einzelner Stoffe ermöglichendes Flächenmuster innerhalb der Gelschicht 14 ergibt. Die weitere Auswertung zwecks weiterer Differenzierung des in der Gelschicht 14 erzeugten Musters kann anschließend in an sich bekannter Weise erfolgen.

Man erkennt aus der vorangegangenen Darstellung, daß ausgehend von einer Analysenprobe in einem einzigen Arbeitsgang, nämlich ohne daß das Gel 14' der ersten Dimension gehandhabt werden muß, eine zweidimensionale Zerlegung deren Komponenten durchgeführt wird, welche zu einem charakteristischen flächenhaften Muster in einer Gelschicht führt.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Zerlegen einer Analysenprobe in Fraktionen mit Teilchen von unterschiedlicher elektrischer Ladung, **gekennzeichnet durch** zwei ineinander geschachtelt angeordnete Einrichtungen zur Erzeugung zueinander senkrechter, in den Richtungen (X) und (Y) verlaufender, Trennschichten durchdringender elektrischer Felder, wobei die Analysenprobe im Ausgangszustand in den Wir-

kungsbereich eines dieser Felder einbringbar ist, wobei die Trennschichten durch ein für einen Flüssigkeitsdurchtritt undurchlässiges, für die Teilchen hingegen durchlässiges Medium gebildet werden, wobei die beiden Einrichtungen hinsichtlich des 5 Zerlegungsvorganges nacheinander aktivierbar sind und wobei das Analysenergebnis in einer Trennschicht als Flächenmuster in der (X)-(Y)-Ebene gewinnbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine erste der beiden Einrichtungen 10 ausschließlich mit einer solchen Trennschicht zusammenwirkt, die von den übrigen Trennschichten räumlich getrennt bzw. trennbar ist und daß die zweite der beiden Einrichtungen mit sämtlichen 15 Trennschichten zusammenwirkt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch ein System von drei mit Abstand voneinander angeordneten Trennschichten, deren mittlere mit der genannten ersten Einrichtung zusammen- 20 wirkt, wobei wenigstens eine der seitlichen Trennschichten der Bildung des das Analysenergebnis darstellenden Flächenmusters dient und wobei die Trennschichten durch geeignete Gelschichten (14, 14', 14'') gebildet werden. 25

4. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Einrichtungen aus jeweils zwei, mit Elektroden (11, 12) sowie Spannungsquellen zusammenwirkenden, mit den Trennschichten in Verbindung stehenden, 30 bzw. bringbaren, Pufferlösungen enthaltenden Behältnissen (5, 6, 13) bestehen.

5. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennschichten zwischen zwei aneinander befestigten Glasplatten (1) gehalten sind, deren jeweilige Rückseiten mit einem Wärmeträgermedium, insbesondere einem Kühlmedium beaufschlagbar sind. 35

6. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die 40 Glasplatten (1) sowie wenigstens zwei der genannten Behältnisse (5, 6) auf einem gemeinsamen Bodengestell (7) vorzugsweise aufrechtstehend angeordnet sind und daß die genannten Behältnisse (5, 6) sich an den seitlichen Enden der Glasplatten (1) 45 befinden.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Bodengestell (7) ein weiteres der genannten Behältnisse (13) eingeformt ist.

8. Vorrichtung nach einem der vorangegangenen 50 Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die der genannten ersten Einrichtung zugeordnete Trennschicht über bezüglich der Glasplatten (1) ober- und unterseitig angeordnete, dichtend eingesetzte Rohrelemente (18) mit Elektrodenlösungen 55 enthaltenden Behältnissen (13) in Wirkverbindung stehen.

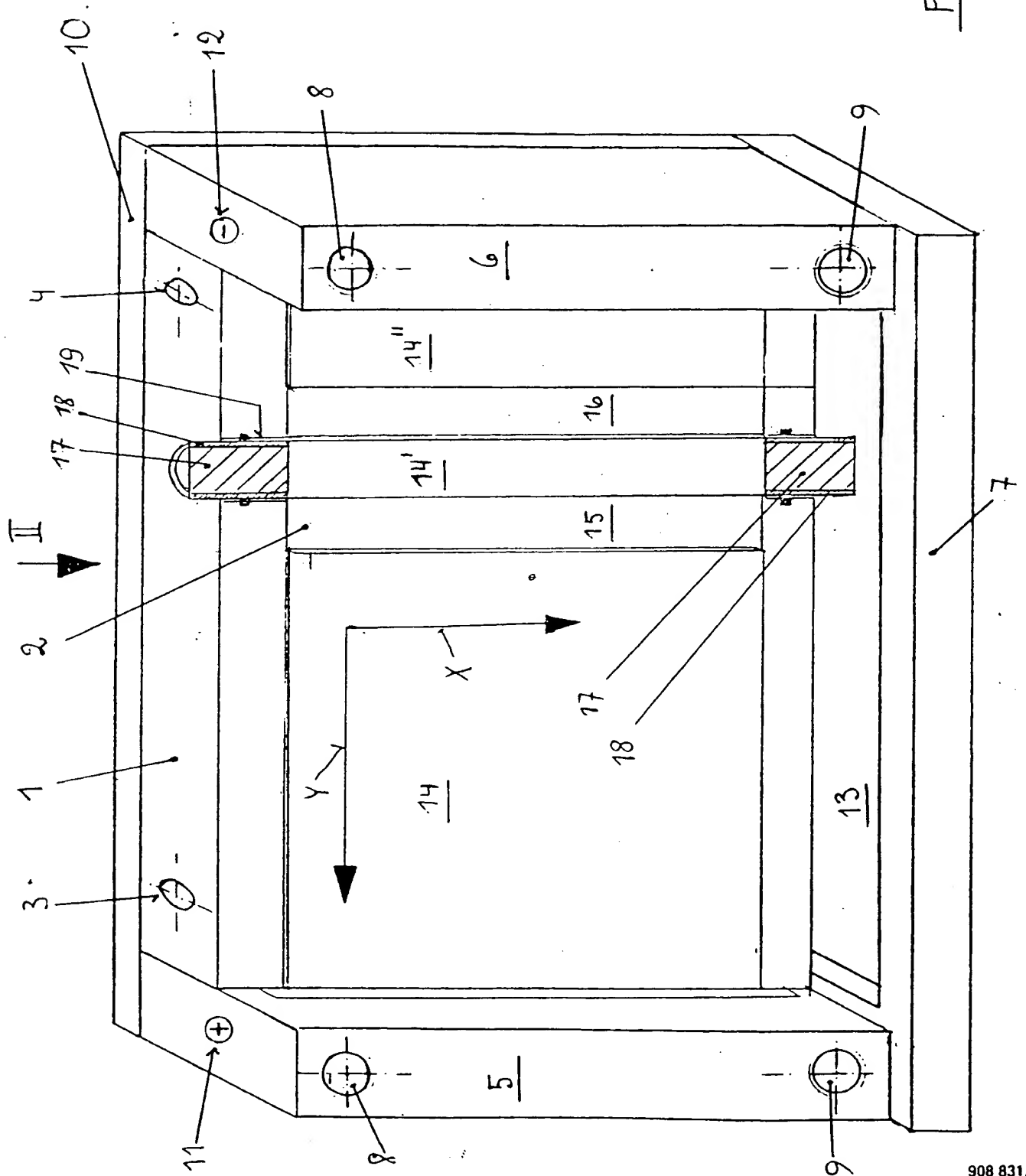
60

65

37 35 872

13

Fig. 1



3735872

14*

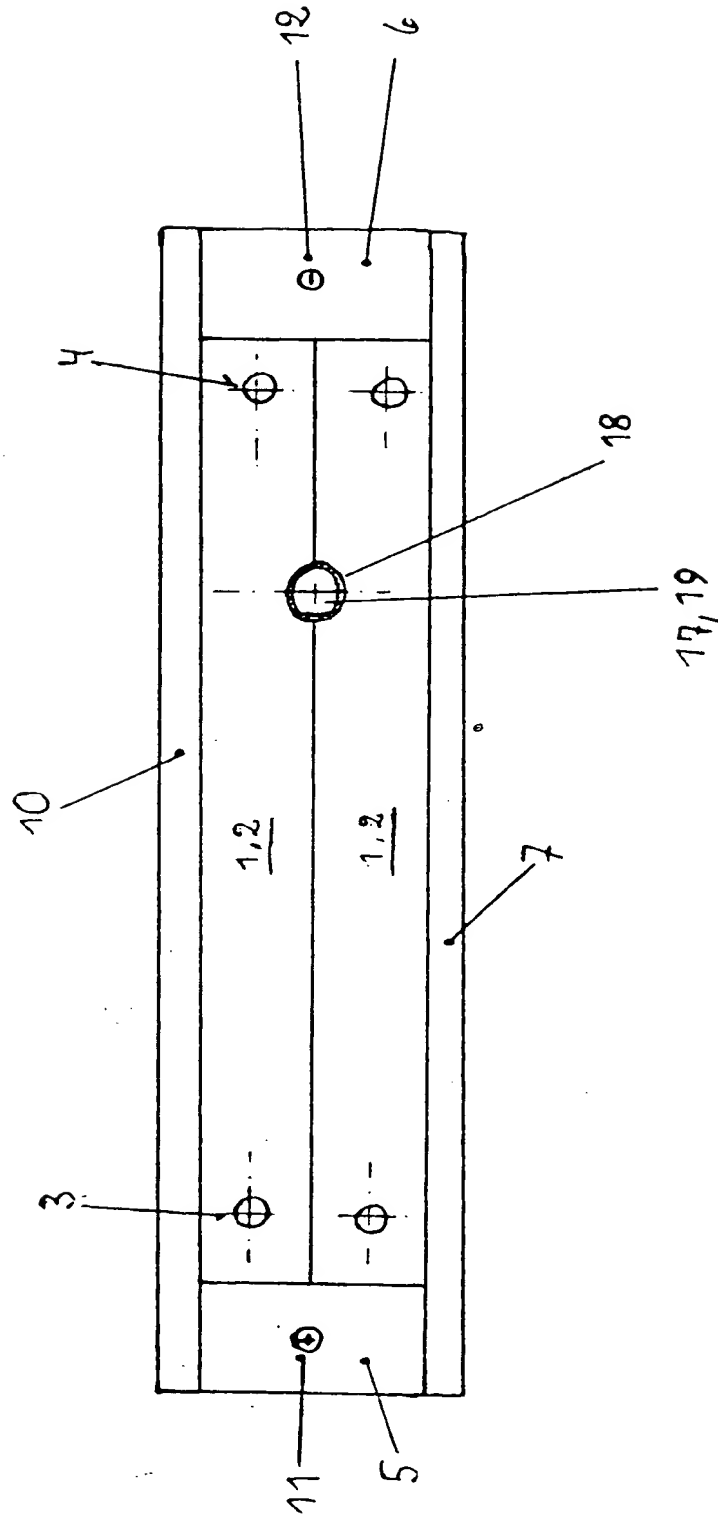


Fig. 2